



TITLE:

Intravital imaging of mouse urothelium reveals activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced intravesical release of ATP(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sano, Takeshi

CITATION:

Sano, Takeshi. Intravital imaging of mouse urothelium reveals activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced intravesical release of ATP. 京都大学, 2017, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20242>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	佐 野 剛 視
論文題目	Intravital imaging of mouse urothelium reveals activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced intravesical release of ATP （マウス尿路上皮生体イメージングが解明したストレッチ誘導性ATP膀胱腔内分泌による細胞外シグナル調節キナーゼの活性化）		
（論文内容の要旨）			
<p>【背景】尿路上皮が機械的刺激を受けると、膀胱腔内および上皮下層側に ATP を分泌することが知られている。上皮下層側に分泌された ATP は、上皮直下に分布する afferent nerve に発現するプリン作動性受容体（P2X2 および P2X3）を活性化し、膀胱知覚に関与する。一方、膀胱腔内に分泌された ATP や尿路上皮に発現するプリン作動性受容体が、どのような分子メカニズムや細胞機能に関与するかは分かっていない。一方、他の組織においては、細胞外 ATP が細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）を活性化すると報告されている。このような膀胱が刺激に対して応答する分子メカニズムの解明に、膀胱の生体イメージングは大変有用であると期待されるが、まだ成功例を見ない。【方法】Förster/fluorescence resonance energy transfer（FRET）の原理を利用して ERK 活性をモニターするバイオセンサーを発現したマウスの膀胱を、二光子顕微鏡を用いて観察した。経尿道カテーテルを介して水圧拡張した膀胱を、全身麻酔下に腹部正中切開で体外に露出させ、臓器固定器具で固定して観察した。膀胱内圧刺激（100 cm もしくは 60 cm 水柱圧）を加え、尿路上皮および平滑筋の ERK 活性をタイムラプス撮影によりモニターした。血小板速度を簡便に測定する方法を考案し、膀胱内圧刺激による血流速度の変化を評価した。ERK の FRET バイオセンサーを不死化ヒト尿路上皮細胞に発現させ、各種刺激や薬剤による ERK 活性の変化を評価した。細胞培地やマウス尿中の ATP 濃度を生物発光アッセイで測定した。【結果】膀胱内圧を 15~20 cm 水柱圧に維持することで膀胱壁の厚さが 150~250 μm になり、膀胱を切開することなく、膀胱全層を長時間安定して観察することができた。観察面の深さや細胞質および細胞核の形態により、尿路上皮や間質細胞、血管内皮、平滑筋を識別できた。膀胱内圧刺激により尿路上皮の ERK が活性化したが、平滑筋では活性化しなかった。膀胱内圧が 60 cm 水柱圧以上になると、上皮下細動脈の血小板速度が顕著に遅くなるか停止することを確認した。しかし、腹部大動脈クランプで膀胱血流を遮断しても ERK は活性化しなかった。また、膀胱を円筒で覆うことで膀胱拡張を抑制すると、膀胱内圧刺激による ERK 活性化が減弱した。不死化ヒト尿路上皮細胞に 60 cm 静水圧を与えても ERK は活性化しなかったが、単軸性の 50% 伸展刺激を加えると ERK が活性化した。さらに、伸展刺激を加えた細胞の培養上清を別の細胞に投与すると ERK が活性化した。静水圧刺激後の培地 ATP 濃度は刺激前と同等であったが、伸展刺激後の培地 ATP 濃度は刺激前より顕著に上昇した。ATP を尿路上皮培養細胞の培地に投与すると ERK が活性化し、その ERK 活性化は ATP シグナル伝達阻害剤（ATP 分解酵素および P2 受容体阻害剤）の前投与により抑制された。さらに単軸性伸展刺激による ERK 活性化も同様の阻害剤前投与で抑制された。マウスにおいても、膀胱内圧刺激後に採取した尿中の ATP 濃度が、非刺激マウスに比べ有意に高かった。また、ATP シグナル伝達阻害剤を膀胱内に前投与すると膀胱内圧刺激による ERK 活性化が有意に抑制された。【結論】膀胱</p>			

<p>内圧刺激を加えると、細胞伸展により尿路上皮からの ATP 膀胱腔内分泌が起こり、ATP シグナル伝達の下流で ERK が活性化することが強く示唆された。マウスの膀胱生体イメージングは、膀胱の生理反応メカニズムを解明する有用なツールとなることが期待される。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>伸展刺激に応答して膀胱腔内に分泌される ATP と尿路上皮に発現するプリン作動性受容体が、生体内でどのような役割を果たすかは十分には分かっていない。この問題を解決するために、ERK 活性をモニターする FRET バイオセンサーを発現したマウスの膀胱を二光子顕微鏡下に観察する手法を申請者は確立した。この手法を用いて、経尿道カテーテルを介した膀胱内圧の上昇が、尿路上皮の ERK 活性を上昇させることを明らかにした。この条件では、尿中の ATP 濃度が上昇しており、ATP シグナル伝達阻害剤を膀胱内に前投与すると膀胱内圧刺激による ERK 活性化が有意に抑制されることから、伸展刺激に応答した ATP 分泌が ERK を活性化することが明らかになった。</p> <p>不死化ヒト尿路上皮細胞においても、細胞伸展が培地中の ATP 濃度を上昇させ、かつ ERK を活性化すること、ATP シグナル伝達阻害剤を前投与すると、細胞伸展による ERK 活性化が抑制されることが確認された。</p> <p>以上の結果は、膀胱内圧の上昇に伴う細胞伸展が尿路上皮からの ATP 分泌を誘導し、分泌された ATP が ERK を介して細胞応答を引き起こすことを強く示唆するものである。</p> <p>以上の研究は、ATP シグナル伝達が ERK を活性化する経路が尿路上皮に存在することを明らかにし、尿路上皮におけるプリン作動性受容体が果たす役割の理解に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 2 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日以降			